



AUSLEGESCHRIFT

1 214 438

Nummer: 1 214 438
 Aktenzeichen: W 15303 IX b/421
 Anmeldetag: 13. November 1954
 Auslegungstag: 14. April 1966

1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, Einrichtungen und Diagnosemittel zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten in von der Frau ausgeschiedenen Körperflüssigkeiten zum Zweck, die empfängnisfreien Tage der Frau zu bestimmen.

Die bekannten Verfahren zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten konnten bisher deshalb nicht zur Bestimmung der empfängnisfreien Tage der Frau herangezogen werden, da in den von der Frau ausgeschiedenen Körperflüssigkeiten stets gewisse Mengen dieser Stoffwechselprodukte vorhanden sind und hierauf gerichtete Nachweisreaktionen für den angegebenen Zweck als zu unzuverlässig erachtet wurden.

Die Erfindung geht von der Aufgabe aus, der geschilderten Schwierigkeit abzuweichen und ein Nachweisverfahren für Gelbkörperstoffwechselprodukte vorzuschlagen, welches eine zuverlässige Bestimmung der empfängnisfreien Tage der Frau ermöglicht.

Die Aufgabe wird gemäß der Erfindung dadurch gelöst, daß mindestens ein in der Körperflüssigkeit vorkommendes Gelbkörperstoffwechselprodukt durch mit einer Farbänderung verbundene Reaktionen bestimmt wird und daß dabei Maßnahmen getroffen werden, um nur bei Anwesenheit solcher Mengen des Stoffwechselproduktes die Farbänderung festzustellen, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

Eine bevorzugt zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens verwendete Einrichtung zeichnet sich dadurch aus, daß unten an einen die zu prüfende Körperflüssigkeit enthaltenden Behälter ein Auslaufrohr lösbar angesetzt ist, das eine feine Austrittsöffnung für die zu prüfende Körperflüssigkeit aufweist, und daß lotrecht unter der Austrittsöffnung ein rohrförmiger Behälter vorgesehen ist, der eine Lösungsmittelsäule enthält und an seinem unteren Ende mit einem Überlaufrohr in Verbindung steht, und daß schließlich die freie Öffnung des Überlaufes so weit unter dem Niveau der freien Austrittsöffnung liegt, daß der aus der feinen Öffnung austretende Flüssigkeitsstrahl die Oberseite der Lösungsmittelsäule in Form einer Folge von Flüssigkeits Tropfen erreicht.

Ein Diagnosemittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Totalvolumen von höchstens 60 ccm mindestens zwei Stoffgemische enthält, von denen das eine im Kontakt mit mindestens einem in einer Körperflüssigkeit der Frau vorkommenden Gelbkörperstoffwechselprodukt zu einer Farbän-

Verfahren, Einrichtung und Diagnosemittel zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten

Anmelder:

FAIAG Aktiengesellschaft
 für Forschung und Industrie,
 Schwerzenbach, Zürich (Schweiz)

Vertreter:

Dr.-Ing. W. Höger
 und Dipl.-Ing. W. Stellrecht M. Sc.,
 Patentanwälte, Stuttgart 1, Uhlandstr. 16

Als Erfinder benannt:

Werner Wild, Zürich (Schweiz)

2

derung führt, während das andere geeignet ist, die Farbänderung derart zu hemmen, daß nur solche Mengen des Stoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

Als Kriterium bei der Bestimmung der empfängnisfreien Zeit bei der Frau galt bisher der Ovulationstermin. Dementsprechend sind alle bisher bekannten Methoden zur Bestimmung der empfängnisfreien Zeit auf eine möglichst genaue Ermittlung der Ovulation als solche gerichtet. Nach neuesten Erkenntnissen des Erfinders ist jedoch die Ovulation in bezug auf die empfängnisfreie Zeit bedeutungslos, weil die einer Ovulation im allgemeinen folgende biologische Sterilität der Frau nicht eine Folge der Ovulation ist, sondern eine solche des sich im geplatzten Graafischen Follikel bildenden Corpus luteum. Aus diesem Grunde wird erfindungsgemäß bei der Bestimmung der empfängnisfreien Zeit nicht die Ovulation, sondern die Funktionstüchtigkeit des Corpus luteum ermittelt.

Der Gelbkörper erzeugt bekanntlich Progesteron, welches im Ablauf des mensuellen Zyklus der Frau die folgenden wichtigen Funktionen ausübt:

1. hemmt es die weitere Eireifung auf den Ovarien;
2. lähmt es die Gebärmuttermuskulatur als Schutz für das
3. unter seinem Einfluß sich in den sekretorischen Zustand umwandelnde und »aufwuchernde« Endometrium, und
4. erhöht es als weitere Schutzfunktion für das Endometrium die Viskosität des Zervikalschleimpfropfs in der Cervix.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Frau selbst zu Hause angewendet werden kann. Während im Laboratorium jede den Verfahrensanforderungen, im besonderen der Extraktion des Stoffwechselproduktes aus der Körperflüssigkeit angepaßte Apparatur geeignet ist, ist für den Laien eine speziell kleindimensionierte Einrichtung, die ein schematisches Arbeiten nach Gebrauchsanweisung ermöglicht, unerlässlich. Zur raschen und zuverlässigen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens durch Laien wird das Diagnosemittel, d. h. die notwendigen Chemikalien, Lösungsmittel, Reagenzien, Farbstoffe usw. zweckmäßig als für je eine Bestimmung gebrauchsfertig dosierte und möglichst lange haltbare Packung zubereitet. Diese Packungen bestehen z. B. aus Ampullen, Röhrchen u. dgl. aus Glas oder Kunststoff sowie in Form von Portionenpackungen abgeschweißten Plastikschläuchen usw. Solche für je eine Bestimmung kombinierten Pakungen ersparen nicht nur das lästige Abmessen der einzelnen Portionen, sondern gewährleisten auch eine größere Haltbarkeit als z. B. bei immer wieder geöffneten Flaschen.

Ein solches erfindungsgemäß kombiniertes Diagnosemittel wiegt verpackt beispielsweise 30 g und hat ein Volumen von etwa 34 ccm; es läßt sich zu Jahrespackungen zu zwölf bis zwanzig Bestimmungen mit einem Totalgewicht von rund 500 g zusammenstellen. Das einzelne Diagnosemittel für eine Bestimmung wiegt nicht ganz 16 g und besitzt ein Volumen von rund 19 ccm, also bedeutend weniger als bei sämtlichen bekannten Pregnandiolbestimmungsverfahren, von denen kein einziges mit total weniger als 60 bis 70 ccm Chemikalien auskommen kann.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nachfolgend in einer für den Pregnandiol-Pregnanolon-Komplex bevorzugten Ausführung rein beispielsweise beschrieben:

Fig. 1 zeigt einen zur Einrichtung gehörigen Extraktionsapparat im Betriebszustand;

Fig. 2 zeigt eine ganze Einrichtung ineinandergeschachtelt im Nichtbetriebszustand;

Fig. 3 zeigt einen Schüttelbecher für die Waschflüssigkeiten mit aufgesetztem Deckel;

Fig. 4 zeigt einen Gefäßhalter mit einem Reaktionsgefäß, einem Brenner und einem Kondensatorschlauch im Betriebszustand.

Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß der Pregnandiolkomplex aus dem frischen, während 8 bis 10 Stunden ausgeschiedenen und dann mit Kochsalz abgesättigten Urin extrahiert, der Extrakt gewaschen, der Pregnandiol-Pregnanolon-Komplex anschließend direkt als Bariumsalz gefällt und dann als Präzipitat auf seinen Glukuronsäuregehalt mit Hilfe der Tollens-Reaktion untersucht wird. Sowohl in der Extraktionsstufe, der Extraktwaschung, der Fällung als auch der Farbreaktion nach Tollens sind in das Verfahren gewollte Hemmstufen eingebaut, welche seine Empfindlichkeit auf den weiter obengenannten Schwellenwert reduzieren. Auf diese Hemmstufen wird später noch näher hingewiesen.

Der zweckmäßigerweise vom Laien zu verwendende Extraktionsapparat (Fig. 1) besteht aus einem Basisgefäß 1 und einem in diesem eingesetzten Extraktor 2 (Rohrdurchmesser vorteilhaft 10,5 mm, nicht über 20 mm), welcher am Basisgefäß 1 mittels Dichtungen 9 hermetisch abschließt. Am Extraktor 2 ist über eine Dichtung 14

ein Düsenstück 3 (Düsendurchmesser vorteilhaft 0,58 mm) angeschraubt und auf diesem über eine Dichtung 18 ein Kopfgefäß 4. Im Kopfgefäß 4 ist eingelegt ein mit einer Spannfeder 6 gehaltenes Sieb 7, und das Ganze ist verschlossen mit einem aufgelegten Deckel 5. Im oberen Teil des Extraktors 2 befinden sich eine aus einem Kolben 15, einer Anschlagschraube 16, einer Druckfeder 17 und einem Ventilschlauch 25 bestehende Pumpe sowie ein aus einem Ventilknopf 12, einer Ventilscheibe 11, einer Dichtung 10 und einer Durchlaßöffnung 13 bestehendes Ventil. Am Extraktor 2 sind seitlich angebracht ein Überlauf 2a sowie zuunterst ein Verschlußdeckel 8. Im oberen Teil des Düsenstückes 3, d. h. unmittelbar über der Düse, kann ein Regulierventil angebracht werden, um den Druck des durch die Düse strömenden Urinstrahles zu regulieren; dieses Ventil ist indessen nicht unbedingt notwendig und deshalb in der Zeichnung weggelassen.

Im Nichtbetriebszustand der Einrichtung (Fig. 2) sind Kopfgefäß 4, Düsenstück 3 sowie alle übrigen Bestandteile im Innern des Basisgefäßes 1 untergebracht. Die Einrichtung besitzt dann nur noch rund ein Drittel ihrer Betriebshöhe. Der Deckel 5, dessen Dichtung 19 dazu bestimmt ist, einen Schüttelbecher 23 abzuschließen (Fig. 3), ist nun im oberen Teil des Extraktors 2 eingeschraubt, wo im Betriebszustand das Düsenstück 3 befestigt wird. Das Ventil 12 ist geschlossen und der Pumpenkolben 15 wird vom Deckel 5 niedergehalten. Zwei auf den Extraktor 2 aufgeklebte Drahtklammern 24 sind dazu bestimmt, die beiden Reaktionsgefäße 21, z. B. aus feuerfestem Glas (von denen im Schnitt Fig. 2 nur eines gezeichnet ist), und das Düsenstück 3 im Innern des Basisgefäßes bzw. des Kopfgefäßes 4 festzuhalten. Zuunterst ist der Schüttelbecher 23 vom erweiterten Beruhigungsteil des Extraktors 2, dahinter ein Brenner 24 und daneben ein Gefäßhalter 20 fixiert. Ein Kondensatorschlauch 26 (Fig. 4) und das Sieb 6, 7 sind, weil elastisch und deshalb überall im Innern der Einrichtung unterbringbar, nicht eingezeichnet.

Als Sammelgefäß für den Harn und zu seiner Ab-sättigung mit Kochsalz dient das Basisgefäß 1. Die Harnmenge aus 8 bis 10 Stunden Ausscheidungs-dauer wird mit Leitungswasser bis zur unteren Marke am Basisgefäß 1 (Fig. 1) ergänzt, was einer Menge von 700 ccm entspricht, welche Menge innerhalb 8 bis 10 Stunden selten überschritten wird. Hierauf wird so viel Kochsalz beigelegt, daß das Flüssigkeitsniveau von der unteren bis zur oberen Marke ansteigt (770 ccm). Nun wird der Extraktor 2 mit eingeschraubten Deckeln 5 und 8 in das Basisgefäß 1 eingesetzt, so daß dieses durch die Dichtungen 9 hermetisch verschlossen wird. Nach 40 Sekunden dauerndem, kräftigem Schütteln ist der Urin mit dem zugegebenen Kochsalz abgesättigt.

Während des Schüttelns füllt sich der Extraktor 2 durch den anliegenden Überlauf 2a ebenfalls mit Harn. Nach Abschrauben des Deckels 5 zur Freilegung der oberen Öffnung des Extraktorrohres 2 wird das aus der Scheibe 11, der Dichtung 10 und der Öffnung 13 bestehende Ventil 12 geöffnet. Dieses erlaubt der Luft bei der anschließenden Extraktion, bei welcher sich das Basisgefäß 1 langsam füllt, den Abzug. Nach Einfüllen der z. B. in einer Portionenpackung aus Kunststoffschlauch enthaltenen Extraktflüssigkeit, bestehend aus 9 ccm Amylbutyl-

Diese vier Genitalfunktionen sind aber nur gewährleistet, wenn die Progesteronproduktion des Gelbkörpers ein genügend hohes Maß erreicht.

Bei ungenügender Progesteronproduktion bzw. einem nicht voll funktionstüchtigen Corpus luteum (was mit oder ohne äußere Einflüsse der Fall sein kann, wie z. B. Kuren, Klimawechsel, Krankheiten usw.) ist als erstes die Hemmung der Eireifung auf den Ovarien nicht immer gewährleistet. Es bildet sich dann innerhalb der nächsten 8 bis 10 Tage ein zweiter sprungreifer Follikel im gleichen Menstruationszyklus heran, der unmittelbar vor der üblicherweise folgenden Regelblutung beim normalen Rückgang der an sich schon zu geringen Progesteronmenge platzt. Es ergibt sich eine prämenstruelle Sekundäroovulation, die in der sogenannten »empfangnisfreien« Zeit zur Empfängnis führen kann. Der bei der Sekundäroovulation entstehende zweite Gelbkörper verhindert das Eintreten der zu diesem Zeitpunkt üblichen Menstruation und verschiebt diese bis zu seiner Degeneration um 12 bis 14 Tage, sofern die Sekundäroovulation nicht zur Befruchtung geführt hat. Selbstverständlich kann sich die prämenstruelle Sekundäroovulation auch bei einem voll funktionstüchtigen Corpus luteum ereignen; eine Befruchtung ist dann aber nicht möglich, weil bei genügend hoher Progesteronproduktion die Gebärmuttermucosa sich in aufgewuchertem Zustand und der Zervikalschleim sich in erhöhter Viskosität befinden, so daß diese beiden natürlichen Barrieren den eindringenden Spermatozoen den Eintritt und Durchgang durch die Gebärmutter und infolgedessen das Aufsteigen bis zu den Ovarien verwehren.

Diese Zusammenhänge konnten experimentell unter praktischer Erprobung durch eine größere Anzahl Ehepaare festgestellt werden. Es ergaben sich dabei prämenstruelle Sekundäroovulationen sowohl bei ungenügender als auch genügender Gelbkörperaktivität. Dabei stellten sich aber nur im ersten Fall Schwangerschaften ein, während der zweite Typ von Sekundäroovulationen ohne Folgen blieb.

Gemessen am wichtigsten Ausscheidungsprodukt des Progesterons, dem Pregnandiolglukuronid, das in seinem Komplex als »Verunreinigung« 25% Pregnanolon mitenthält, ergab sich auf Grund dieser empirischen Versuche, daß im durchschnittlichen Fall bei einer Tagesausscheidung von 3,5 mg Pregnandiolglukuronid (inklusive Pregnanolon) und in einigen Einzelfällen von mindestens 2,5 mg vom Vorliegen eines funktionstüchtigen Gelbkörpers gesprochen werden kann. Dieser Zusammenhang stimmt gut überein mit der bereits bekannten Tatsache, daß während der Proliferationsphase des Endometriums 1 bis 2 mg Pregnandiolglukuronid pro Tag im Harn der Frau ausgeschieden werden, welche Minimalmengen dem Nebennierenrindenzellstoffwechsel oder einer zu frühen Luteinisierung des Follikels entstammen. Demgegenüber betragen, wie bekannt, die in der eigentlichen Gelbkörperphase ausgeschiedenen Normalmengen an Pregnandiolglukuronid im Mittel 8 bis 9 mg pro Tag.

Unterhalb des obengenannten Schwellenwertes von 3,5 bzw. 2,5 mg Pregnandiolglukuronid pro Tag ergeben sich befruchtungsfähige Sekundäroovulationen, weil dann die gleichzeitige Aufwucherung der Gebärmutter Schleimhaut als auch die Erhöhung der

Zervikalschleimviskosität unvollkommen sind und nicht als Barrieren wirken können, während Sekundäroovulationen oberhalb dieses Schwellenwertes nicht mehr befruchtungsfähig sind.

Bei Beachtung der genannten Schwellenwerte hingegen läßt sich aber nicht nur die Funktionstüchtigkeit des Gelbkörpers nachweisen, sondern gleichzeitig werden auch die geringen aus dem Nebennierenrindenzellstoffwechsel stammenden (Umwandlung des Desoxycorticosterons in Progesteron) sowie die schon präovulativ im ungeplatzten Follikel allfällig erzeugten Mengen an Progesteron bzw. Pregnandiol »überbrückt«. Die bisher bekannten Verfahren, sei es nun zur Progesteron- oder Pregnandiolbestimmung sowie weitere Verfahren zur Bestimmung anderer Abbauprodukte des Progesterons können mit Empfindlichkeitsschwellen versehen werden, die den weiter obengenannten Schwellenwerten äquivalent sind. Damit werden solche rein quantitativen Stoffbestimmungsverfahren automatisch zu qualitativen Verfahren zur Bestimmung der empfangnisfreien Zeit, sofern die zu ihrer Durchführung benötigte Verfahrensdauer nicht zu lang ist, um die Reaktion so frühzeitig zu erhalten, daß noch eine befriedigende Ausnützung möglich ist.

Die Einführung eines solchen Schwellenwertes in irgendwelche bekannten Verfahren läßt sich einfach dadurch erreichen, daß z. B. die Sichtbarkeit einer Farbreaktion bis zur vorgeschriebenen Grenze aufgehoben wird. Dies läßt sich erzielen, indem entweder durch beschränkte stöchiometrische Umsetzung nur so viel des reagierenden Stoffes in die Farbreaktion aufgenommen wird, daß diese erst beim Schwellenwert infolge ihrer eigenen Empfindlichkeitsgrenze anspricht (z. B. Verwendung schlechter Lösungsmittel, damit nur ein Teil des reagierenden Stoffes in Lösung geht), oder aber indem die Farbreaktion selbst durch chemisch oder physikalisch wirkende Zusätze gehemmt wird. Solche Zusätze können oxydierende oder reduzierende (bleichende) und auch komplexbildende Stoffe sein, die den entsprechenden Farbanteil maskieren, oder auch Adsorptions- oder Fällungsmittel, die den Schwellenwertanteil in sich aufnehmen oder ausfällen, oder Komplementärfarben, die den Schwellenwertanteil kompensieren.

Die heute bekannten Verfahren zur Bestimmung von Progesteron im Blut bzw. seinen Abbauprodukten und speziell Pregnandiol im Harn sind für die Geburtenkontrolle praktisch unbrauchbar und eignen sich nur für klinisch-diagnostische Zwecke. Sie sind durchweg umständlich, verlangen teure Apparaturen und hochqualifiziertes Personal. Darüber hinaus liefern sie allesamt die Resultate mit so großer Verspätung, daß an eine praktische Anwendung ohne bedeutende Modifikationen gar nicht zu denken ist. Das Verfahren nach der Erfindung vermeidet diese Nachteile. Da der Nachweis der empfangnisfreien Zeit keine quantitative Hormonbestimmung erfordert, sondern nur die Feststellung eines Minimal-Hormanspiegels in halbqualitativer Weise, ist ein einfaches, rasch durchführbares Verfahren entwickelt worden.

Das Verfahren ist so einfach durchführbar und der zu seiner Durchführung nötige Zeitaufwand so gering, daß es nicht nur für das speziell zum Zweck der Feststellung der empfangnisfreien Zeit für seine Kundinnen eingerichtete Laboratorium geeignet ist, sondern darüber hinaus von jedem Laien bzw. jeder

alkohol im Volumenverhältnis 1:2, in das Extraktorrohr 2 bildet sich in diesem eine Lösungsmittelsäule, die sich auf dem salzgesättigten Urin darin aufschichtet; infolge des Überlaufes stellt sich das Lösungsmittel immer auf gleiches Niveau ein, nämlich etwa 4 cm unter der Düse. Nach dem Einfüllen werden auf den Extraktor 2 das Düsenstück 3 und auf dieses das Kopfgefäß 4 aufgeschraubt und in dieses letztere das Sieb 6, 7 eingelegt. Hierauf wird das mit salzgesättigtem Urin gefüllte Basisgefäß 1 abgenommen und in das Kopfgefäß 4 entleert. Das Basisgefäß 1 wird sofort wieder unten angebracht, da bald Urin durch den Überlauf entweicht; der Deckel 5 wird auf das Gefäß 4 aufgelegt und der Apparat beiseite gestellt.

Die Harnmenge von rund 770 ccm strömt nun während ungefähr 35 Minuten in feinem Strahl durch die Düse und prallt auf die Oberfläche des im Extraktor befindlichen Amylbutylalkohols an jener Stelle auf, wo sich der Strahl in feine Tröpfchen aufzulösen beginnt (Durchflußmenge etwa 22 ccm je Minute). Hierbei wird der Harn in viele winzig kleine Tröpfchen zerschlagen, die langsam durch die Lösungsmittelschicht absinken, sich unter dieser wieder mit dem bereits extrahierten Harn vereinigen, durch den Überlauf 2a emporsteigen und ins Basisgefäß 1 zurückfließen. Hierbei erfolgt die Extraktion des Pregnandiolglukuronides aus dem Harn.

Nach dem Passieren des Urins werden das Gefäß 4 und das Düsenstück 3 abgeschraubt, mit Wasser gespült und wieder angebracht. Die zur Extraktwaschung erforderliche Waschflüssigkeit, bestehend aus 5 ccm ammoniakalischem Äther-Butanol-Gemisch (aus einer Portionenpackung aus Kunststoff) im Volumenverhältnis 5:1 und 0,5 ccm Wasser mit 200 mg darin gelöstem Kochsalz, wird unter Zusatz von 35 ccm Trink- bzw. Leitungswasser in dem mit dem Deckel 5 verschlossenen Schüttelbecher 23 kräftig vermischt (Fig. 3) und ins Kopfgefäß 4 entleert. Die Waschflüssigkeit passiert nun gleich wie der Harn bei der Extraktion die Extraktphase, wäscht diese, so daß der größte Teil der Verunreinigungen aus dem Extrakt ausgewaschen wird. Infolge des Äthercharakters der Waschflüssigkeit und der kleinen Kochsalzzugabe geht das Pregnandiolglukuronid in der Großzahl aller Fälle nicht in die Waschflüssigkeit über. Es gibt indessen aber Ausnahmefälle bei außerordentlich schwach verunreinigten Harnen: die Verunreinigungen sind dann bereits im ersten Moment der Waschung aus dem Extrakt entfernt, so daß der größte Teil der Waschflüssigkeit ohne weitere Stoffaufnahme den Extrakt passiert und aus diesem Grunde das Pregnandiolglukuronid trotz Äther- und Kochsalzgehalt auswaschen kann. In solchen Fällen chronisch schwach verunreinigter Extrakte empfiehlt es sich, jeweils von den rund 40 ccm gemischter Waschflüssigkeit nur zwei Drittel oder in Extremfällen nur die Hälfte zu verwenden. Anschließend erfolgt eine Nachwaschung mit 35 bis 40 ccm gesättigtem Kochsalzwasser zwecks Entwässerung des trüben Extraktes und Entfernung von überschüssigem Ammoniak. Der Extrakt ist hierauf meistens farblos klar.

Nach dem Absetzen der letzten, feinsten in Suspension befindlichen Salzwassertröpfchen (2 bis 3 Minuten nach der Salzwasserwaschung) werden Düsenstück 3 und Kopfgefäß 4 abgeschraubt und das Ventil 12 geschlossen. Das Urinniveau im Basis-

gefäß 1 steht infolge der Volumenzunahme durch die Waschflüssigkeiten nun etwas über der Überlauföffnung 2a. Ein entsprechend geformter Stechheber (in den Zeichnungen nicht dargestellt) wird auf die Dichtung 14 gepreßt und mit dem Zeigefinger der andern freien Hand der Pumpenkolben 15 betätigt. Der auf den Kolben drückende Finger ist zugleich Einlaßventil, und die ins Basisgefäß 1 gedrückte Luft wird durch den Ventilschlauch 25 am Entweichen gehindert. Durch den im Inneren des Gefäßes 1 erzeugten Überdruck steigt die Extraktphase im Extraktor empor, bis sie sich vollständig in dem auf der Dichtung 14 ruhenden Stechheber befindet. Dessen freie Öffnung am oberen Ende wird nun mit dem Finger zugehalten und der Extrakt in eines der Reaktionskölbchen 21 aus feuerfestem Glas umgeleert, das innen trocken sein muß. Anstatt mit Überdruck durch die Pumpe 15 kann der Extrakt natürlich auch mittels Pipette und Saugballchen aus dem Extraktor 2 herausgesaugt werden. Die delicate Pumpeinrichtung ließe sich so erübrigen.

Der gewaschene Extrakt ist trotz seiner Farblosigkeit noch relativ stark verunreinigt. Aus diesem Grunde wird das Pregnandiolglukuronid vorteilhaft als Bariumsalz direkt aus dem Extrakt ausgefällt, was infolge der Löslichkeits- und Konzentrationsverhältnisse nicht in herkömmlicher Weise möglich ist. Dem Extrakt werden hierzu aus dem entsprechenden Beutel des Diagnosemittels 0,3 g Silicagel von 0,2 bis 1,0 mm Körnung zugesetzt, das mit rund 28 mg Bariumacetat durch Wässern in destilliertem Wasser mit 100 g Bariumacetat je Liter und nachheriges Trocknen imprägniert ist. Extrakt und Silicagel werden ungefähr 1 Minute lang mäßig geschüttelt. Zuerst lagert sich hierbei am Silicagel ein Teil der im Extrakt verbliebenen Restfeuchtigkeit ab und bildet einen Wassermantel um dieses, der das obige Bariumsalz in höchster Konzentration gelöst enthält. Fast gleichzeitig werden vom feuchten Silicagel fast alle im Extrakt vorhandenen Stoffe adsorbiert, indem sie durch den Bariumsalz-Wassermantel passieren. Bei dieser Passage wird das Natrium-Pregnandiolglukuronid augenblicklich als Barium-Pregnandiolglukuronid ausgefällt und infolge der mechanischen Wirkung des Schüttelns in kristalliner Form sofort aus dem Wassermantel heraus in den Extrakt zurückgewaschen. Diese Operation, die sich aus einer Adsorption, fast gleichzeitigen Fällung und quasi Desorption zusammensetzt und theoretisch die konventionellen Stufen der Adsorption, Elution, Trocknung, Neulösung, Fällung usw. in einer einzigen Stufe vollbringt, wird im folgenden als Adsorptionsfällung bezeichnet.

Das Suspensionskristallinat wird mit der flüssigen Phase unter Zurücklassung des Silicagels in ein zweites trockenes Kölbchen 21 umgeleert und zur Beschleunigung der Absetzung der Suspension 0,5 ccm Gasolin, Petroläther, Benzol usw. und 0,1 ccm n/1000-Salzsäure aus einer weiteren Portionenpackung des Diagnosemittels zugesetzt und durch sehr kräftiges Schütteln vermischt. Dadurch werden die festen Kristallinatbestandteile an ihrer Oberfläche naß und »klebrig«; sie lagern sich gegenseitig aneinander ab und sinken dadurch und infolge der durch die Feuchtigkeit verursachten Gewichtszunahme relativ rasch (innerhalb 10 bis 20 Minuten) in den Grund des Kölbchens ab, wo sie ebenfalls infolge ihres Feuchtigkeitsgehaltes klebenbleiben. Hierdurch

wird ein einfaches Ableeren der Mutterflüssigkeit ohne Aufwirbeln des Niederschlages möglich. Der Salzsäuregehalt der Feuchtigkeit verhindert eine Adsorption uronsaurer Verunreinigungen am Präzipitat.

Anschließend wird die überstehende Flüssigkeit abgeleert, das Kölbchen 21 kurze Zeit umgekehrt stehengelassen, um ein restloses Abfließen der Extraktflüssigkeit zu ermöglichen, und der an der Kölbchenwandung klebende Rückstand in Leitungswasser aufgenommen, welches bis zum Teilstrich des Kölbchens 21 (Fig. 4) eingefüllt wird. Diesem Wasser werden 1,5 ccm reine, konzentrierte Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,19) und 0,5 ccm Äthyl- oder Propylalkohol (rein) mit 3 mg Naphthoresorcin aus weiteren Portionenpackungen des Diagnosemittels zugesetzt. Soll die Naphthoresorcinlösung mindestens 1 Jahr haltbar gemacht werden, so wird der Alkohol entlüftet (durch Kochen unter Rückflußkondensation) und hierauf vor der Lösung des Naphthoresorcins mit CO_2 gesättigt.

Zum Abstellen der Kölbchen 21 bedient man sich des Kölbchenhalters 20 (Fig. 4), der mit dem eingespannten Kölbchen 21 zusammen ein sicher stehendes Dreibein bildet, da er an seinem Ende einen breiten, zweizehigen Fuß besitzt. Sofern keine andere Flamme zur Verfügung steht, wird der lediglich aus einem Nöpfchen bestehende Brenner 22 (Fig. 4) mit Alkohol, Brennsprit, einer Metatablette, Kölnisch Wasser usw. oder, wenn jedes andere Brennmaterial fehlt, beim Abgießen mit der Extraktphase gefüllt (die allerdings beim Brennen etwas rußt) und angezündet. Auf das Kölbchen 21 wird der Kondensatorschlauch 26 aufgesetzt und das Reaktionsgemisch nach Beginn des Siedens während einer Minute über der Flamme gekocht. Der beim Kochen aus dem Kölbchen entweichende übelriechende Dampf kondensiert dabei im Kondensatorschlauch 26, so daß die ganze Reaktion praktisch geruchlos vor sich geht. Diese Geruchsvernichtung durch Kondensation ist von Bedeutung, denn ohne sie würde in vielen Fällen die Anwendung durch Laien, also in Wohnräumen, unmöglich gemacht.

Nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches wird der Kondensatorschlauch 26 in horizontaler Lage vom Kölbchen 21 abgenommen, um ein Auslaufen des Kondensates zu vermeiden. Aus der letzten Portionenpackung des Diagnosemittels werden 1,5 ccm mit 4 mg Anilin-Fettgrün je Liter leicht grüngelbten Benzols, Toluols oder Xylols zugesetzt und das Ganze kräftig während 15 bis 20 Sekunden geschüttelt.

Die von der sich oben abscheidenden Benzolschicht ausgeogene rotviolette Färbung ist die Indikation für die empfängnisfreie Zeit. Bleibt die Lösung grün, wasserklar oder gelb bis bräunlich, so ist entweder gar keine oder eine ungenügende Gelbkörperaktivität und infolgedessen Empfängnisgefahr vorhanden. In diesem Fall wird die Analyse 2 bis 3 Tage später wiederholt, bis die rotviolette Färbung erscheint. Normalerweise reicht eine monatlich ein- bis zweimalige Vornahme der Bestimmung für die Praxis vollständig aus, wobei die erste Bestimmung bei z. B. 28- bis 30tägigem Zyklus auf den 17. bis 18. Zyklustag fällt. Die eigentliche Arbeitszeit zur Vornahme der Bestimmung beträgt nur rund 15 Minuten und deren gesamthafte Durchführungsdauer etwa 1 Stunde (gegenüber einigen Stunden Arbeitszeit und einigen Tagen Durchführungsdauer bei be-

kannten Verfahren zur Pregnandiolbestimmung). Die präovulative empfängnisfreie Zeit wird wie bisher auf Grund der Methode nach Knaus—Ogino berechnet, wobei sich in der Praxis zeigte, daß die Zuverlässigkeit durch diese Kombination nur unwesentlich verändert wird, weil eine Vorverlegung der Ovulation sehr selten vorkommt.

Gegenüber den bisher bekannten Verfahren unterscheidet sich das vorliegende vor allem in bezug auf seine außerordentliche Spezifität und seine relative Empfindlichkeit, was die Verwendung von weniger als ein Drittel Tagesharmmenge zuläßt. Der äußerst geringe Zeitaufwand erlaubt es, den Eintritt der empfängnisfreien Zeit schon 8 bis 9 Stunden nach Beginn der ersten Pregnandiolbildung im weiblichen Organismus festzustellen. Damit kann praktisch von einer Verspätung gegenüber dem biologischen Eintritt der sterilen Phase nicht mehr gesprochen werden.

Die Art der Extraktion in dünnem Strahl ist bedingt durch die äußerst geringe Menge der verwendeten Lösungsmittel von nur 9 ccm bzw. ein Fünftel bis ein Zwanzigstel der bekannten Verfahren. Bei herkömmlicher Extraktionsart (Schütteln, Preßluft-einblasen, Rührwerk usw.) würde sich die kleine Lösungsmittelmenge unter der mechanischen Einwirkung schon in ungefähr 500 ccm salzgesättigtem Urin völlig auflösen. Die Zugabe von Amylalkohol zum Butylalkohol reduziert die Löslichkeit für Pregnandiol und stellt infolgedessen eine erste Stufe im totalen Schwellenwert dar.

Die Waschungsart besitzt gegenüber konventionellen Arten durch beispielsweise zweimaliges Ausschütteln mit je einem Drittel des Extraktvolumens an n/3- bis n/10-Natronlauge eine rund dreißigmal höhere Wirksamkeit, die einerseits durch die das Extraktvolumen um ein Mehrfaches übersteigende Waschflüssigkeitsmenge und andererseits durch den Äthercharakter des Waschwassers bedingt ist, welches letztere wiederum einem Übergang des Pregnandiolglukuronides in die Waschflüssigkeit stark entgegenwirkt. Da es jedoch unmöglich ist, den Übergang eines kleinen Anteils an Pregnandiol in die Waschflüssigkeit zu verhindern, so stellt dieser restliche Übergang einen weiteren Teil des Gesamtschwellenwertes dar.

Die wichtigste und das Verfahren am meisten verbessernde sowie auch verkürzende Operation ist die Adsorptionsfällung. Sie kann als katalytische Fällung bezeichnet werden, wobei das Adsorbens die Rolle des Katalysators spielt. Außer der wesentlichen Vereinfachung der Methode bietet sie den Vorteil, daß die Fällung zu einer ausgesprochen zeitbedingten Operation wird: nur dem am raschesten und leichtesten ausfallenden Stoff gelingt sie, da alle eventuell langsamer ausfallenden Stoffe bereits vor ihrer Fällung am Silicagel fest gebunden sind. Die Adsorptionsfällung ist deshalb spezifischer als die konventionellen Fällungsmethoden. Da das Zurückbleiben geringer Mengen Ba-Pregnandiol in kristalliner Form im Innern der Poren des Silicagels nicht zu verhindern ist, ferner ein weiterer Teil einfach am Silicagel ohne andere Umsetzungen adsorbiert bleibt und ein anderer Teil noch im Extrakt gelöst enthalten ist, ergibt sich ein gewisser Verlust an Pregnandiol im Endresultat, der wiederum als Anteil am Gesamtschwellenwert zu betrachten ist.

Die Zugabe von n.1000-HCl und Gasolin nach erfolgter Fällung zum Extrakt dient zur Beschleunigung der Absetzung und zur Vermeidung der Adsorption von Verunreinigungen am Präzipitat. Durch die Ausziehung des bei der Glukuronsäurereaktion nach Tollens gebildeten Farbstoffes mittels Benzol oder seiner Homologen an Stelle von Äther wird der Test spezifischer. Durch die Grünfärbung des Benzols werden schwach positive Befunde vermieden, indem jede nur schwache Rotfärbung durch die Komplementärfarbe Grün überdeckt wird. Infolgedessen sind jene physiologischen Minimalwerte an Pregnandiol, welche ihre Ursache in der Umwandlung des Desoxycorticosterons in Progesteron, in einer präovulativen ovariellen Progesteronsekretion und in einer eventuell ungenügenden »normalen« Gelbkörperaktivität haben, nicht feststellbar. Diese Grünfärbung soll als wichtigster Teil des Gesamtschwellenwertes dessen genaue Einstellung ermöglichen. Die gleiche Wirkung wie durch die verschiedenen aufgeführten Einzelstufen des Schwellenwertes könnte durch Reduktion des anfänglich verwendeten Volumens Körperflüssigkeit der Frau bzw. Urin insofern erzielt werden, als daß dann die gesamthaft durch das Verfahren laufenden Mengen einfach der natürlichen Empfindlichkeitsgrenze der Bestimmungsmethode unterworfen würden. Solche natürlichen Empfindlichkeitsgrenzen besitzen indessen meistens sehr stark »schleichenden« Charakter mit einer breiten Schwankungszone, so daß ein eigentlicher Schwellenwertpunkt auf diese Weise kaum erreichbar wäre.

Praktische Versuche mit dem neuen, erfindungsgemäßen Verfahren haben eine wesentlich höhere Zuverlässigkeit als bei den besten herkömmlichen Verhütungsmitteln ergeben. Es hat sich gezeigt, daß das Versagerisiko dieser neuen Art Geburtenregelung um acht- bis zehnmal geringer ist als bei den bisherigen Methoden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten in von der Frau ausgeschiedenen Körperflüssigkeiten zu dem Zweck, die empfängnisfreien Tage der Frau zu bestimmen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein in der Körperflüssigkeit vorkommendes Gelbkörperstoffwechselprodukt durch mit einer Farbänderung verbundene Reaktionen bestimmt wird und daß dabei Maßnahmen getroffen werden, um nur bei Anwesenheit solcher Mengen des Stoffwechselproduktes die Farbänderung festzustellen, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein in der Körperflüssigkeit der Frau vorkommendes Gelbkörperstoffwechselprodukt unter Bildung eines Farbstoffes zur Reaktion gebracht und die Erkennbarkeit dieses Farbstoffes so weit reduziert wird, daß nur solche Mengen des Stoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein im Urin der Frau vorkommendes Progesteronstoffwechselprodukt unter Bildung eines Farbstoffes zur Reaktion ge-

bracht und dieser Farbstoff durch die Gegenwart eines Komplementärfarbstoffes so weit maskiert wird, daß nur solche Mengen des Progesteronstoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß im Urin der Frau vorkommendes Pregnandiolglukuronid in Gegenwart eines Gemisches von mindestens zwei Reaktionsstoffen in einen Farbstoff übergeführt und dieser hierauf mit einem Lösungsmittel aus der Reaktionslösung ausgezogen wird, welches Lösungsmittel eine so große Menge eines Komplementärfarbstoffes enthält, daß nur solche Mengen Pregnandiolglukuronid erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in Gegenwart von Salzsäure und Naphthoresorcin eine Glukuronsäurereaktion des im Urin der Frau vorkommenden Pregnandiolglukuronides erfolgt und daß dabei der gebildete rotviolette Farbstoff durch Benzol ausgezogen wird, das eine so große Menge eines grünen Komplementärfarbstoffes enthält, daß nur solche Mengen Pregnandiolglukuronid erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

6. Einrichtung in Form eines Extraktionsapparates zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß unten an einen die zu prüfende Körperflüssigkeit enthaltenden Behälter (4) ein Auslaufrohr (3) lösbar angesetzt ist, das eine feine Austrittsöffnung für die zu prüfende Körperflüssigkeit aufweist, und daß lotrecht unter der Austrittsöffnung ein rohrförmiger Behälter (2) vorgesehen ist, der eine Lösungsmittelsäule enthält und an seinem unteren Ende mit einem Überlaufrohr (2a) in Verbindung steht, und daß schließlich die freie Öffnung des Überlaufes (2a) so weit unter dem Niveau der feinen Austrittsöffnung liegt, daß der aus der feinen Öffnung austretende Flüssigkeitsstrahl die Oberseite der Lösungsmittelsäule in Form einer Folge von Flüssigkeitstropfen erreicht.

7. Einrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Abmessungen der feinen Öffnung des Extraktionsapparates derart sind, daß sie einen Flüssigkeitsstrahl von höchstens 100 ccm pro Minute durchläßt, und daß der rohrförmige Behälter (2) einen Durchmesser von höchstens 20 mm besitzt.

8. Diagnosemittel zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Totalvolumen von höchstens 60 ccm mindestens zwei Stoffgemische enthält, von denen das eine im Kontakt mit mindestens einem in einer Körperflüssigkeit der Frau vorkommenden Gelbkörperstoffwechselprodukt zu einer Farbveränderung führt, während das andere geeignet ist, die Farbveränderung derart zu hemmen, daß nur solche Mengen des Stoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

9. Diagnosemittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens zwei Stoffgemische enthält, von denen das eine im Kon-

takt mit mindestens einem im Urin der Frau vorkommenden Progesteronstoffwechselprodukt zur Bildung eines Farbstoffes führt, während das andere eine Komplementärfarbe dazu aufweist, die durch Zusatz zum Farbstoff diesen so weit maskiert, daß nur solche Mengen des Stoffwech-

selproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

In Betracht gezogene Druckschriften:

5 The American Journal of Physiology, 121, H. 1. 1938, S. 98 bis 106.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

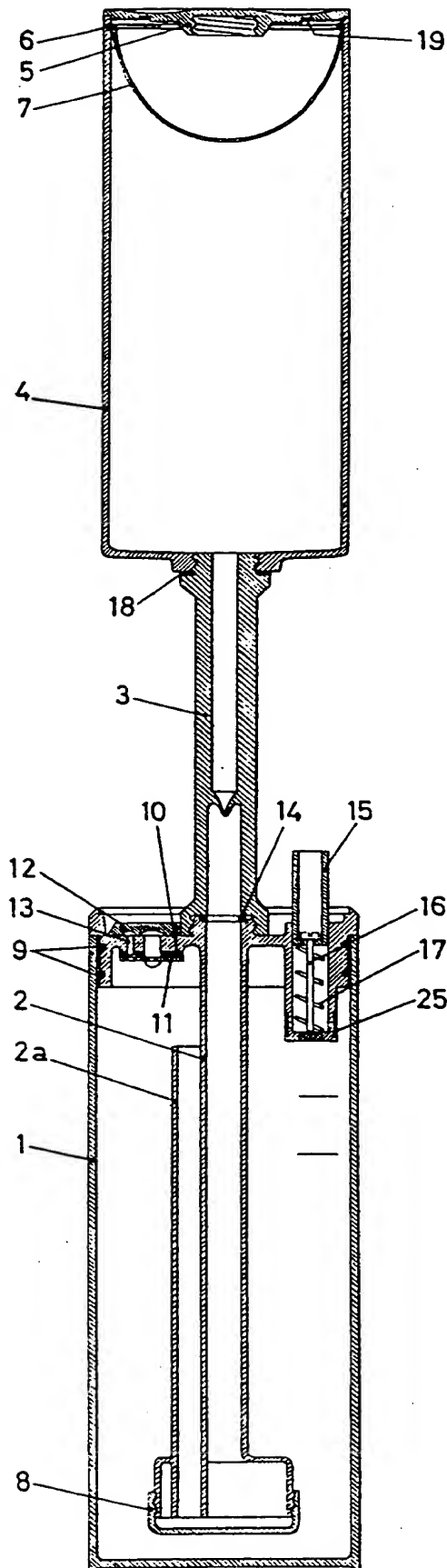


Fig. 4

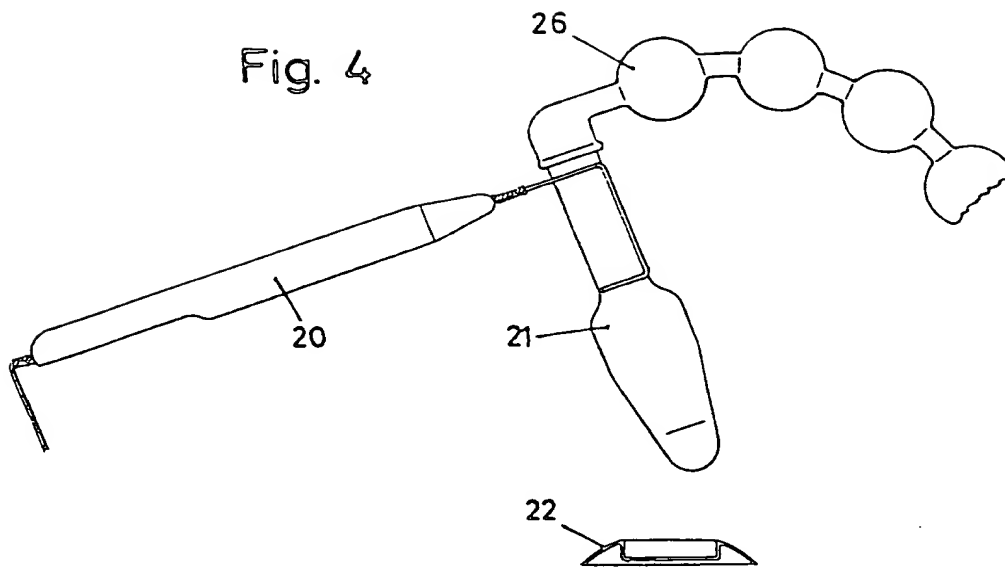


Fig. 3

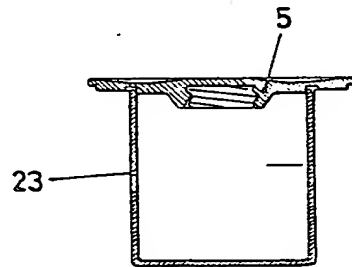
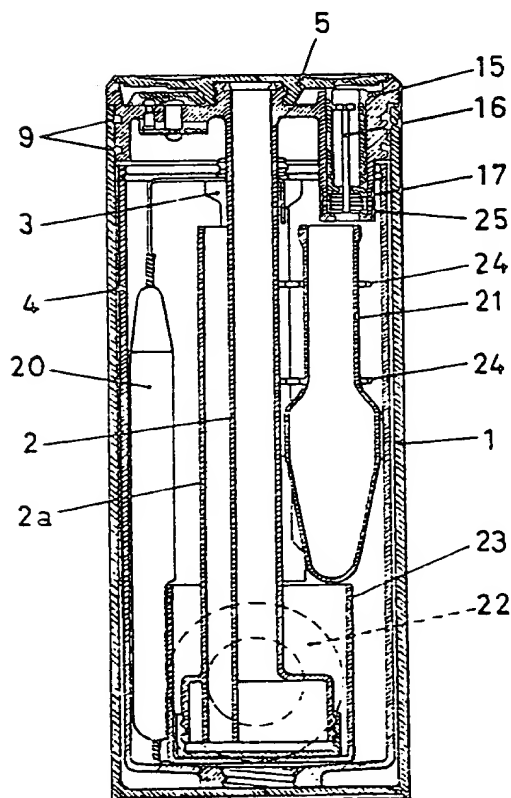


Fig. 2



Federal Republic of Germany
German Patent Office

Published Examined Specification 1214438

5

Int. Cl.: G 01 n

German Cl.: 421-3/54

Number: 1 214 438

Reference: W 15303 IX b/421

Application date: 13 November

10

1954

Publication date: 14 April

1966

Procedure, appliance and diagnostic agent for the
detection of corpus luteum metabolic products

Applicant:

15

FAIAG Aktiengesellschaft für Forschung und Industrie
Schwerzenbach, Zurich (Switzerland)

Representative:

20

Dr.-Ing. W. Höger
and Dipl.-Ing. W. Stellrecht M. Sc.,
Patent Attorneys, Stuttgart 1, Uhlandstr. 16

Named as inventor:

Werner Wild, Zurich (Switzerland)

25

The invention relates to a procedure, devices
and diagnostic agents for the detection of corpus
luteum metabolic products in the body fluids excreted
by women for the purpose of determining the non-
30 conceptive days of the women.

THIS PAGE BLANK (USP)

The known procedures for the detection of corpus luteum metabolic products were previously unable to be used for the determination of the conception-free days of the women, since certain amounts of these
5 metabolic products are always present in the body fluids excreted by the women and detection reactions directed at these were considered as too unreliable for the purpose indicated.

The invention starts from the object of
10 remedying the difficulty outlined and proposing a detection procedure for, corpus luteum metabolic products which makes possible a reliable determination of the conception-free days of women.

The object is achieved according to the
15 invention in that at least one corpus luteum metabolic product occurring in the body fluid is determined by means of reactions associated with a colour change and in that measures are taken here in order to detect the colour change only in the presence of those amounts of
20 the metabolic product which originate from a functional corpus luteum.

An appliance preferably used for carrying out the detection procedure according to the invention is distinguished in that an outlet tube, which has a fine
25 outlet opening for the body fluid to be tested, is removably attached at the bottom to a container containing the body fluid to be tested, and in that a tubular container which contains a solvent column and is connected at its lower end to an overflow tube is
30 provided perpendicularly under the outlet opening, and in that finally the free opening of the overflow is so far below the level of the free outlet opening that the fluid jet emerging from the fine opening reaches the top of the solvent column in the form of a series of
35 liquid drops.

A diagnostic agent for carrying out the procedure according to the invention is characterized in that it contains at least two substance mixtures in a total volume of at most 60 cc, of which one, on

THIS PAGE BLANK (USPTO)

contact with at least one corpus luteum metabolic product occurring in a body fluid of the woman, leads to a colour change, while the other is suitable to inhibit the colour change in such a way that only those
5 amounts of the metabolic product are detectable which originate from a functional corpus luteum.

The ovulation date was regarded until now as a criterion in the determination of the non-conceptive period in women. Accordingly, all methods known to date
10 for the determination of the non-conceptive period are directed at a determination of ovulation as such which is as accurate as possible. According to the most recent knowledge of the inventor, however, ovulation is meaningless in relation to the non-conceptive period,
15 because the biological sterility of women which in general follows an ovulation is not a result of the ovulation, but one of the corpus luteum forming in the implanted graafian follicle. For this reason, not ovulation, but the functionability of the corpus
20 luteum, is detected according to the invention in the determination of the non-conceptive period.

As is known, the corpus luteum produces progesterone, which exerts the following important functions in the course of the menstrual cycle in
25 women:

1. it inhibits further maturation of the ovum in the ovaries;
2. it paralyses the uterine musculature as protection for the
- 30 3. endometrium which is changing and "growing" in the secretory state under its influence, and
4. as a further protective function for the endometrium, it increases the viscosity of the cervical mucous plug in the cervix.

35 These four genital functions, however, are only guaranteed if the progesterone production of the corpus luteum reaches an adequately high level.

In the case of inadequate progesterone production or a not completely functional corpus luteum

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(which can be the case with or without external influences, such as, for example, health cures, changes of climate, diseases etc.), the inhibition of the maturation of the ovum in the ovaries is not always
5 guaranteed as the first thing. Within the next 8 to 10 days a second follicle which is ready to burst is then formed in the same menstrual cycle, which bursts immediately before the menstrual period which customarily follows during the normal decrease in the
10 amount of progesterone, which per se is already too low. A premenstrual secondary ovulation results, which can lead to conception in the so-called "non-conceptive" period. The second corpus luteum forming in the secondary ovulation prevents the occurrence of the
15 menstruation which is customary at this point in time and shifts this up to its degeneration by 12 to 14 days if the secondary ovulation has not led to fertilization. Of course, the premenstrual secondary ovulation can also occur in a completely functional
20 corpus luteum; fertilization, however, is then not possible, because in the case of sufficiently high progesterone production the uterine mucosa are in the grown state and the cervical mucus is of increased viscosity, so that these two natural barriers block the
25 penetrating spermatozoa from entering and passing through the uterus and as a result ascending to the ovaries.

These connections were found experimentally under practical testing by a relatively large number of
30 married couples. Premenstrual secondary ovulations resulted here, both in the case of inadequate and adequate corpus luteum activity. Pregnancies arose, however, only in the first case, while the second type of secondary ovulations remained without consequences.

35 Measured on the most important excretion product of progesterone, pregnanediol glucuronide, which additionally contains 25% of pregnanolone in its complex as an "impurity", it turned out on the basis of these empirical experiments that in the average case it

THIS PAGE BLANK (USPTO)

is possible to speak of the presence of a functional corpus luteum with a daily excretion of 3.5 mg of pregnanediol glucuronide (including pregnanolone) and in some isolated cases of at least 2.5 mg. This relationship agrees well with the already known facts that during the proliferation phase of the endometrium 1 to 2 mg of pregnanediol glucuronide per day are excreted in the urine of women, which minimum amounts originate from the corticoadrenal metabolism or premature luteinisation of the follicle. On the other hand, as known, the normal amounts of pregnanediol glucuronide excreted in the actual corpus luteum phase are on average 8 to 9 mg per day.

Below the abovementioned threshold value of 3.5 or 2.5 mg of pregnanediol glucuronide per day, fertilizable secondary ovulations result, because the simultaneous growth of the uterine mucous membrane and the increase in the cervical mucus viscosity are incomplete and cannot act as barriers, whereas secondary ovulations above this threshold value are no longer fertilizable.

On consideration of the threshold values mentioned on the other hand, however, not only the functionability of the corpus luteum can be detected, but at the same time the small amounts of progesterone or pregnanediol originating from the corticoadrenal metabolism (conversion of the deoxycorticosterone into progesterone) and the amounts already ubiquitously produced preovulatively in the unburst follicle are also "reconciled". The previously known procedures, be they now for progesterone or pregnanediol glucuronide determination, and further procedures for the determination of other degradation products of progesterone, can be provided with sensitivity thresholds which are equivalent to the threshold values mentioned further above. Thus, those purely quantitative substance determination procedures automatically become qualitative procedures for the determination of the non-conceptive period if the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

procedure time needed for carrying them out is not too long, in order to keep the reaction so early that a satisfactory utilization is still possible.

5 The introduction of such a threshold value into any known procedure can be simply achieved in that, for example, the obviousness of a colour reaction is raised up to the prescribed limit. This can be achieved in that either, as a result of restricted stoichiometric reaction, only so much of the reacting substance is
10 absorbed in the colour reaction that it responds only at the threshold value as a result of its intrinsic sensitivity limit (e.g. use of poor solvents in order that only part of the reacting substance goes into solution), or else in that the colour reaction itself
15 is inhibited by chemically or physically acting additives. Such additives can be oxidizing or reducing (bleaching) and also complex-forming substances which mask the corresponding colour components, or alternatively adsorbent or precipitating agents which
20 in themselves take up or precipitate the threshold component, or complementary colours which compensate the threshold component.

The procedures for the determination of progesterone in the blood or its degradation products
25 and especially pregnanediol glucuronide in the urine known today are virtually unusable for birth control and are suitable only for clinical diagnostic purposes. They are involved in every respect and require expensive equipment and highly qualified personnel.
30 Moreover, all of them produce the results with so great a delay that practical application cannot be considered at all without significant modifications. The procedure according to the invention avoids these disadvantages. As the detection of the non-conceptive period does not
35 necessitate any quantitative hormone determination, but only the determination of a minimum hormone level in a semiquantitative manner, a simple procedure which can be carried out rapidly has been developed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The procedure can be carried out so simply and the expenditure of time needed for carrying it out are so low that it is suitable not only for the laboratory equipped for its clients especially for the purpose of
5 determining the non-conceptive period, but moreover can be used by any unskilled people or any woman herself at home. Whereas in the laboratory any apparatus which is adapted to the procedure requirements, in particular the extraction of the metabolic products from the body
10 fluid, is suitable for unskilled people a specially small-sized device which makes possible schematic operation according to use instructions is indispensable. For the rapid and reliable carrying-out of the procedure according to the invention by
15 unskilled people, the diagnostic agent, i.e. the necessary chemicals, solvents, reagents, dyes etc., is expediently prepared as a pack measured ready-for-use for one determination each and which can be kept as long as possible. These packs consist, for example, of
20 ampoules, tubes and the like made of glass or plastic and also plastic tubing etc. sealed off in the form of portion packs. Such combined packs for one determination each not only save the troublesome measurement of the individual portions, but also
25 guarantee greater durability than, for example, in the case of bottles which are opened again and again.

Such a combined diagnostic agent according to the invention in packed form weighs, for example, 30 g and has a volume of approximately 34 cc; it can be
30 combined to give annual packs for twelve to twenty determinations having a total weight of around 500 g. The individual diagnostic agent for one determination does not quite weigh 16 g and has a volume of around 19 cc, i.e. significantly less than in the case of all
35 known pregnanediol glucuronide determination procedures, of which not a single one can manage with a total of less than 60 to 70 cc of chemicals.

The implementation of the procedure according to the invention is described purely for example below

THIS PAGE BLANK (USPTO)

in an embodiment preferred for the pregnanediol glucuronide-pregnanolone complex:

Fig. 1 shows an extraction apparatus belonging to the device in the operating state;

5 Fig. 2 shows a complete device boxed one inside the other in the non-operating state;

Fig. 3 shows a shaking beaker for the wash liquids with an attached cover;

10 Fig. 4 shows a vessel holder with a reaction vessel, a burner and a condenser tube in the operating state.

The procedure consists essentially in extracting the pregnanediol glucuronide complex from the fresh urine, which is excreted during the course of
15 8 to 10 hours and then saturated with sodium chloride, washing the extract, subsequently precipitating the pregnanediol glucuronide-pregnanolone complex directly as a barium salt and then investigating it as a precipitate for its glucuronic acid content with the
20 aid of Tollens reaction. Both in the extraction stage, the washing of the extract, the precipitation and the colour reaction according to Tollens, intentional inhibition stages are incorporated into the procedure which reduce its sensitivity to the threshold value
25 mentioned further above. Reference is later made in greater detail to these inhibition stages.

The extraction apparatus (Fig.1) expediently to be used by unskilled people consists of a basic vessel 1 and an extractor 2 inserted therein (tube diameter
30 advantageously 10.5 mm, not over 20 mm), which hermetically seals to the base vessel 1 by means of seals 9. A nozzle piece 3 (diameter advantageously 0.58 mm) is screwed on the extractor 2 via a seal 14 and a top vessel 4 is screwed onto this via a seal 18. In the
35 top vessel 4 is inserted a sieve 7 held by a tension spring 6, and the whole is closed with a mounted cap 5. In the upper part of the extractor 2 is located a pump consisting of a piston 15, a stop screw 16, a pressure spring 17 and a valve tube 25, and a valve consisting

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of a valve head 12, a valve disc 11, a seal 10 and a passage opening 13. Attached to the side of the extractor 2 is an overflow 2a and at the very bottom a closing cover 8. In the upper part of the nozzle piece 3, i.e. directly above the nozzle, a regulating valve can be attached in order to regulate the pressure of the jet of urine flowing through the nozzle; this valve, however, is not absolutely necessary and is therefore left out in the drawing.

10 In the non-operating state of the device (Fig. 2) the top vessel 4, the nozzle piece 3 and all other components are accommodated in the interior of the base vessel 1. The device then has only around one third of its operating height. The cover 5, whose seal 19 is
15 intended to seal a shaker beaker 23 (fig. 3), is then screwed into the upper part of the extractor 2, where the nozzle piece 3 is fixed in the operating state. The valve 12 is closed and the pump piston 15 is held down by the cover 5. Two wire clamps 24 clamped onto the
20 extractor 2 are intended to retain the two reaction vessels 21, e.g. of fire-resistant glass (of which only one is shown in section in Fig. 2), and the nozzle piece 3 in the interior of the base vessel or of the top vessel 4. At the very bottom, the shaker beaker 23
25 is fixed by the widened calming part of the extractor 2, below a burner 24 and in addition a vessel holder 20. A condenser tube 26 (Fig. 4) and the sieve 6,7 are, because they are elastic and therefore accommodatable everywhere in the interior of the device, not
30 indicated.

The base vessel 1 serves as a collection vessel for the urine and for its saturation with sodium chloride. The amount of urine from an excretion time of 8 to 10 hours is made up with tap water to the mark on
35 the base vessel 1 (Fig. 1), which corresponds to an amount of 700 cc, which amount is rarely exceeded within 8 to 10 hours. So much sodium chloride is added to this that the liquid level rises from the lower to the upper mark (770 cc). Extractor 2 with the screwed-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

on covers 5 and 8 is then inserted into the base vessel 1 so that this is hermetically sealed by the seals 9. After vigorous shaking lasting for 40 seconds, the urine is saturated with the added sodium chloride.

5 During the shaking, the extractor 2 is also filled with urine by the adjacent overflow 2a. After unscrewing the cover 5 to expose the upper opening of the extractor tube 2, the valve 12 consisting of the disc 11, seal 10 and the opening 13 is opened. This
10 allows for the escape of the air in the subsequent extraction, in which the base vessel 1 slowly fills. After filling of the extraction fluid contained, for example, in one portion pack of plastic tubing, consisting of 9 cc of amyl butyl alcohol in the volume
15 ratio 1:2 into the extractor tube 2, a solvent column is formed in this which forms a layer on the salt-saturated urine; as a result of the overflow, the solvent always adjusts to the same level, namely approximately 4 cm below the nozzle. After filling, the
20 nozzle piece 3 is screwed onto the extractor 2 and the top vessel 4 is screwed onto this and into the latter is placed the sieve 6,7. After this, the base vessel 1 filled with salt-saturated urine is taken off and emptied into the top vessel 4. The base vessel 1 is
25 immediately attached again at the bottom, since urine soon escapes through the overflow; the cover 5 is placed on the vessel 4 and the apparatus is put aside.

The amount of urine of around 770 cc then flows for approximately 35 minutes in a fine jet through the
30 nozzle and impacts on the surface of the amyl butyl alcohol in the extractor at that position where the jet begins to break up into fine droplets (flow quantity approximately 22 cc per minute). The urine is broken here into many minutely small droplets, which slowly
35 fall through the solvent layer, combine under this again with the already extracted urine, ascend through the overflow 2a and flow back into the base vessel 1. The extraction of the pregnanediol glucuronide from the urine takes place here.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

After the passage of the urine, the vessel 4 and the nozzle piece 3 are unscrewed, rinsed with water and attached again. The washing fluid necessary for the extract washing, consisting of 5 cc of ammoniacal ether-butanol mixture (from a portion pack made of plastic) in the volume ratio 5:1 and 0.5 cc of water with 200 mg of sodium chloride dissolved therein, is vigorously mixed in the shaking beaker 23 closed by the cover 5 (Fig. 3) and emptied into the top vessel 4. The washing liquid then passes, similarly to the urine in the extraction, through the extract phase, and washes this so that the greatest part of the impurities is washed out of the extract. As a result of the ether character of the wash liquid and the small addition of sodium chloride, the pregnanediol glucuronide in the majority of all cases does not pass over into the washing liquid. There are meanwhile, however, exceptional cases with extremely slightly contaminated urines: the impurities are already removed from the extract in the first moment of washing, so that the greatest part of the washing liquid passes through the extract without further absorption of substance and for this reason can wash out the pregnanediol glucuronide despite the ether and sodium chloride content. In such cases of chronically slightly contaminated extracts, it is recommended in each case to use only two thirds of the around 40 cc of mixed washing liquid or in extreme cases only half. Rewashing with 35 to 40 cc of saturated brine for the purpose of dewatering of the turbid extract and removal of excess ammonia then takes place. The extract is then usually colourless and clear.

After the deposition of the last, finest brine droplets in suspension (2 to 3 minutes after washing with brine), nozzle piece 3 and top vessel 4 are unscrewed and the valve 12 is closed. The urine level in the base vessel 1 is now somewhat above the overflow opening 2a as a result of the volume increase due to the washing liquids. An appropriately shaped plunging

THIS PAGE BLANK (USPTO)

syphon (not shown in the drawings) is pressed onto the seal 14 and the pump plunger 15 is actuated with the index finger of the other free hand. The finger pressing on the plunger is at the same time an inlet valve, and the air forced into the base vessel 1 is prevented from escaping by the valve tubing 25. As a result of the excess pressure generated in the interior of the vessel 1, the extract phase ascends in the extractor until it is completely in the plunging syphon resting on the seal 14. Its free opening at the upper end is then kept shut with the finger and the extract is emptied into one of the small reaction flasks 21 made of fireproof glass, which must be dry inside. Instead of using excess pressure through the pump 15, the extract can of course also be sucked out of the extractor 2 by means of pipette and suction valve. The delicate pump device could thus be superfluous.

Inspite of its colourlessness, the washed extract is still relatively highly contaminated. For this reason, the pregnanediol glucuronide is advantageously precipitated directly from the extract as the barium salt, which is not conventionally possible because of the solubility and concentration conditions. To this end, 0.3 g of silica gel of 0.2 to 1.0 mm grain size, which is impregnated with around 28 mg of barium acetate by hydration in distilled water containing 100 g of barium acetate per litre and subsequent drying, are added to the extract from the corresponding bag of diagnostic agent. The extract and silica gel are moderately shaken for approximately 1 minute. In this procedure, a part of the residual moisture remaining in the extract is first deposited on the silica gel and forms a water sheath around this, which contains the above barium salt dissolved in a very high concentration. Almost simultaneously, almost all substances present in the extract are adsorbed by the moist silica gel by passing them through the barium salt/water sheath. In this passage, the sodium pregnanediol glucuronide is precipitated momentarily as

THIS PAGE BLANK (USPTO)

barium pregnanediol glucuronide and as a result of the mechanical action of the shaking is immediately washed back into the extract from the water sheath. This operation, which is made up of an adsorption, almost simultaneous precipitation and quasi-desorption and theoretically completes the conventional stages of adsorption, elution, drying, redissolution, precipitation etc. in a single stage, is designated below as adsorption precipitation.

10 The suspension crystallizate is emptied into a second dry bulb 21 with the liquid phase leaving behind the silica gel and, to accelerate the deposition of the suspension 0.5 cc of gasoline, petroleum ether, benzene etc. and 0.1 cc of N/1000 hydrochloric acid is added
15 from a further portion pack of the diagnostic agent and mixed by very vigorous shaking. Owing to this, the solid crystal constituents become wet and "tacky" on their surface; they mutually deposit on one another and, owing to this and as a result of the increase in
20 weight caused by the moisture, fall relatively rapidly, (within 10 to 20 minutes) into the base of the bulb, where they likewise stay stuck as a result of their moisture content. By means of this, simple emptying of the mother liquid without stirring up the precipitate
25 becomes possible. The hydrochloric acid content of the moisture prevents adsorption of uronic acid impurities on the precipitate.

 The supernatant liquid is then emptied off, the bulb 21 is allowed to stand inverted for a short time
30 in order to make possible residue-free emptying of the extract liquid, and the residue sticking to the bulb wall is taken up in tap water, which is poured in up to the graduation mark of the bulb 21 (Fig. 4). 1.5 cc of pure, concentrated hydrochloric acid (specific weight
35 1.19) and 0.5 cc of ethyl or propyl alcohol (pure) containing 3 mg of naphthoresorcinol are added to this water from further portion packs of the diagnostic agent. If the naphthoresorcinol solution is to be made storable for at least one year, the alcohol is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

deaerated (by boiling with reflux condensation) and after this saturated with CO₂ before dissolving the naphthoresorcinol.

To put down the flask 21, use is made of the flask holder 20 (Fig. 4), which together with the inserted flask 21 forms a securely standing tripod, as it has a broad, two-toed foot at its end. If no other flame is available, the burner 22 (Fig. 4), consisting only of a little bowl, is filled with alcohol, methyated spirit, a Meta tablet, eau de cologne etc. or, if every other fuel is lacking, is filled with the extract phase on pouring off (which, however, smokes somewhat on burning) and ignited. The condenser tubing 26 is mounted on the flask 21 and the reaction mixture is heated over the flame for one minute after the start of boiling. The vile-smelling vapour escaping from the flask on boiling condenses in the course of this in the condenser tubing 26, so that the whole reaction proceeds virtually without odour. This destruction of odour by condensation is of importance, since without it use by unskilled people, i.e. in living rooms, would in many cases be made impossible.

After the cooling of the reaction mixture, the condenser tubing 26 is removed from the flask 21 in the horizontal position in order to avoid running-out of the condensate. From the last portion pack of the diagnostic agent, 1.5 cc of benzene, toluene, or xylene which has been coloured slightly green with 4 mg of Aniline Oleogreen per litre are added and the entire mixture is vigorously shaken for 15 to 20 seconds.

The red-violet colouration extracted from the benzene layer seperating out at the top is the indication of the non-conceptive period. If the solution remains green, water-clear or yellow to brownish, either no corpus luteum activity at all or an inadequate corpus luteum activity and consequently danger of conception is present. In this case, the analysis is repeated 2 to 3 days later until the red-violet colouration appears. Normally, carrying out the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

determination once or twice monthly is completely sufficient in practice, the first determination falling on the 17th to 18th day of the cycle in, for example, a 28- to 30-day cycle. The actual working time for
5 carrying out the determination is only around 15 minutes and its entire implementation time is approximately 1 hour (compared with a few hours working time and a few days implementation time in known procedures for pregnanediol glucuronide determination).
10 The preovulative non-conceptive period is calculated as previously on the basis of the method according to Knaus Ogino, it becoming evident in practice that the reliability is only insignificantly modified by this combination, because bringing forward of the ovulation
15 very rarely occurs.

Compared with the previously known procedures, the present procedure differs especially with respect to its extraordinary specificity and its relative sensitivity, which allows the use of less than one
20 third of the daily urine output. The extremely low expenditure of time allows the onset of the non-conceptive period to be determined just 8 to 9 hours after the start of the first pregnanediol glucuronide formation in the female body. Thus in practice, a delay
25 relative to the biological onset of the sterile phase can no longer be spoken of.

The manner of extraction in a thin jet is due to the extremely small amount of solvent used of only 9 cc or one eighty-fifth of the urine output or around
30 one tenth to one twentieth of the known procedure. In the conventional type of extraction (shaking, compressed air injection, stirrer etc.) the small amount of solvent would completely dissolve even in approximately 500 cc of salt-saturated urine under the
35 mechanical action. The addition of amyl alcohol to the butyl alcohol reduces the solubility for pregnanediol glucuronide and consequently constitutes a first stage in the total threshold value.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Compared with conventional types, the type of washing by, for example, shaking twice with one third each of the extract volume of $N/3$ to $N/10$ sodium hydroxide solution has around a thirty times higher efficiency, which is caused on the one hand, by the amount of washing liquid exceeding the extract volume by several times and on the other hand by the ether character of the washing water, the latter of which in turn strongly counteracts a transition of the pregnanediol glucuronide into the washing fluid. However, since it is impossible to prevent the transition of a small portion of pregnanediol glucuronide into the washing fluid, this residual transition constitutes a further part of the total threshold value.

The operation which is most important and improves and also shortens the procedure the most is adsorption precipitation. It can be designated as catalytic precipitation, the adsorbent playing the role of the catalyst. Apart from the significant simplification of the method, it offers the advantage that the precipitation becomes a decidedly time-dependant operation: only the most rapidly and most easily precipitating substance succeeds it, as all possibly more slowly precipitating substances are firmly bound to the silica gel even before their precipitation. Adsorption precipitation is therefore more specific than the conventional precipitation methods. As the remaining behind of small amounts of Ba pregnanediol glucuronide in crystalline form in the inside of the pores of the silica gel cannot be prevented, and in addition a further part simply remains adsorbed on the silica gel without other reactions and another part is contained still dissolved in the extract, a certain loss of pregnanediol glucuronide arises in the final results, which in turn is to be considered as a component of the total threshold value.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The addition of N/1000 HCl and gasoline to the extract after precipitation has taken place serves to accelerate the deposition and to avoid the adsorption of impurities on the precipitate. Owing to the
5 extraction of the dye formed in the glucuronic acid reaction according to Tollens by means of benzene or its homologues instead of ether, the test becomes more specific. As a result of the green colouration of the benzene, weakly positive results are avoided in that
10 any only slightly red colouration is masked by the complementary colour green. Consequently, those physiological minimum values of pregnanediol glucuronide which have their cause in the conversion of deoxycorticosterone into progesterone, in a preovulat
15 ovarian progesterone secretion and in a possibly inadequate "normal" corpus luteum activity are not determinable. As the most important part of the total threshold value, this green colouration should make possible its exact adjustment. The same effect as due
20 to the various individual stages of the threshold value mentioned could be achieved by reduction of the volume of the body fluid of women or urine initially used in so far as that the total amounts passing through the procedure would be subject simply to the natural
25 sensitivity limit of the determination method. Such natural sensitivity limits, however, usually have very strong "insidious" character with a wide variation zone, so that an actual threshold value point would barely be achievable in this way.

30 Practical experiments using the novel procedure according to the invention have afforded a significantly higher reliability than with the best conventional contraceptive agents. It has been shown that the risk of failure of this novel type of
35 birthcontrol is lower by eight to ten times than in the previous methods.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Claims:

1. Procedure for the detection of corpus luteum metabolic products in the body fluids excreted from women with the purpose of determining the non-conceptive days of the women, characterized in that at least one corpus luteum metabolic product occurring in the body fluid is determined by reactions associated with a colour change and in that measures are taken here in order only to determine the colour change in the presence of those amounts of the metabolic product which originate from a functional corpus luteum.

2. Procedure according to Claim 1, characterized in that a corpus luteum metabolic product occurring in the body fluid of the woman is reacted with formation of a dye and the detectability of this dye is reduced so much that only those amounts of the metabolic product which originate from a functional corpus luteum are detectable.

3. Procedure according to Claim 1 or 2, characterized in that a progesterone metabolic product occurring in the urine of the woman is reacted with formation of a dye and this dye is masked by the presence of a complementary dye to the extent that only those amounts of the progesterone metabolic product which originate from a functional corpus luteum are detectable.

4. Procedure according to one of Claims 1 to 3, characterized in that pregnanediol glucuronide occurring in the urine of the woman is converted into a dye in the presence of a mixture of at least two reaction substances and this is then extracted from the reaction solution with a solvent, which solvent contains such a large amount of a complementary dye that only those amounts of pregnanediol glucuronide which originate from a functional corpus luteum are detectable.

5. Procedure according to one of Claims 1 to 4, characterized in that a glucuronic acid reaction of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

pregnanediol glucuronide occurring in the urine of the woman is carried out in the presence of hydrochloric acid and naphthoresorcinol and in that in the course of this the red-violet dye formed is extracted by means of
5 benzene which contains such a large amount of a green complementary dye that only those amounts of pregnanediol glucuronide which originate from a functional corpus luteum are detectable.

6. Device in the form of an extraction apparatus
10 for carrying out the procedure according to one of the above claims, characterized in that an outlet tube (3) which has a fine outlet opening for the body fluid to be tested is removably attached at the bottom to a container (4) containing the body fluid to be tested,
15 and in that a tubular container (2) which contains a solvent column and is connected at its lower end to an overflow tube (2a) is provided perpendicularly under the outlet opening, and in that finally the free opening of the overflow (2a) is so far below the level
20 of the fine outlet opening that the liquid jet emerging from the fine opening reaches the top of the solvent column in the form of a succession of liquid droplets.

7. Device according to Claim 6, characterized in that the dimensions of the fine opening of the
25 extraction apparatus are such that it lets through a liquid jet of at most 100 cc per minute, and in that the tubular container (2) has a diameter of at most 20 mm.

8. Diagnostic agent for carrying out the procedure
30 according to Claim 1, characterized in that it contains at least two substance mixtures in a total volume of at most 60 cc, of which one, in contact with at least one corpus luteum metabolic product occurring in a body fluid of the woman, leads to a colour change, while the
35 other is suitable for inhibiting the colour change such that only those amounts of the metabolic product which originate from a functional corpus luteum are detectable.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9. Diagnostic agent according to Claim 8,
characterized in that it contains at least two
substance mixtures, of which one, in contact with at
least one progesterone metabolic product occurring in
5 the urine of the woman, leads to the formation of a
dye, while the other has a complementary colour to
this, which masks this by means of addition to the dye
to such an extent that only those amounts of the
metabolic product which originate from a functional
10 corpus luteum are detectable.

Publications taken into consideration:

The American Journal of Physiology, 121, V. 1,
1938, pp. 98 to 106.

15

Herewith 1 sheet of drawings

THIS PAGE BLANK (USPTO)

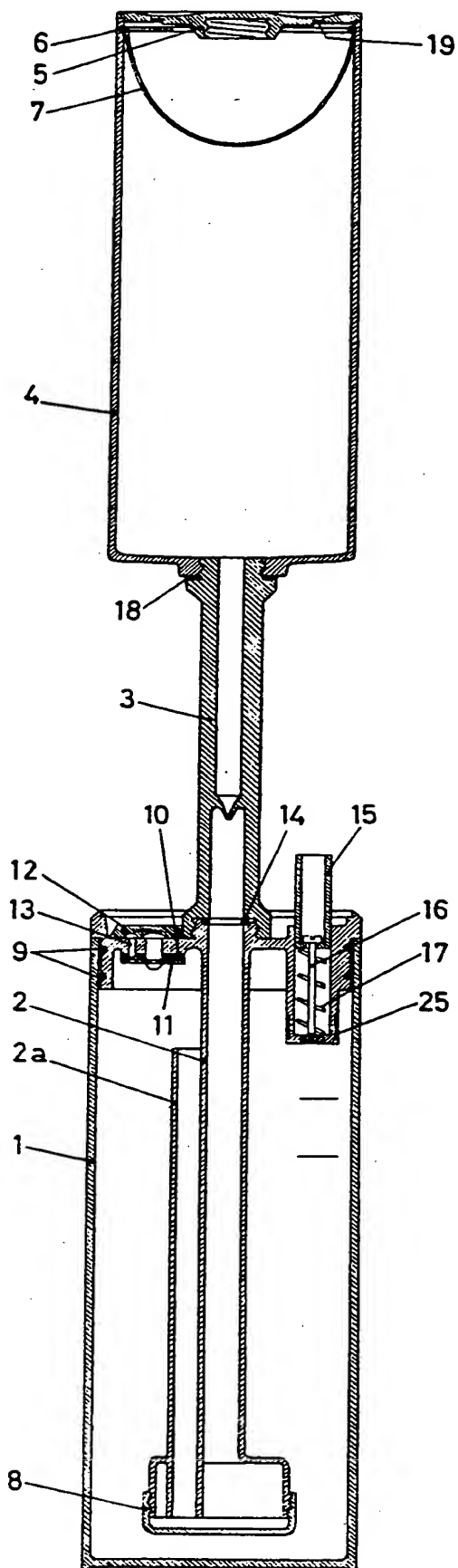


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4

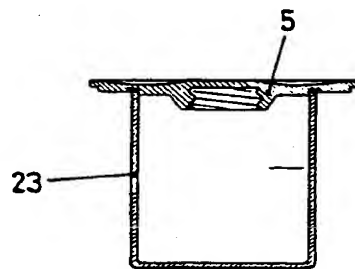
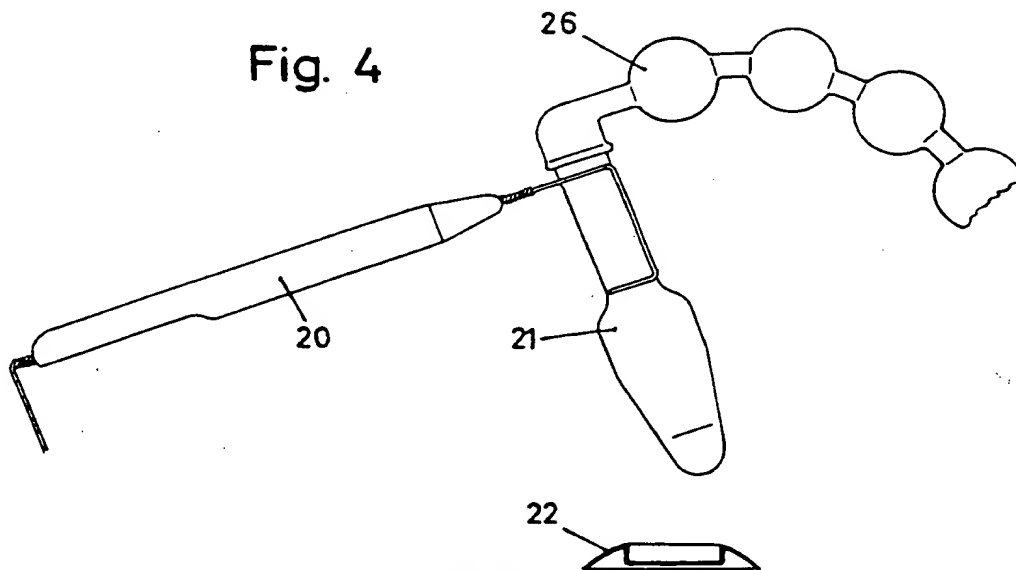


Fig. 3

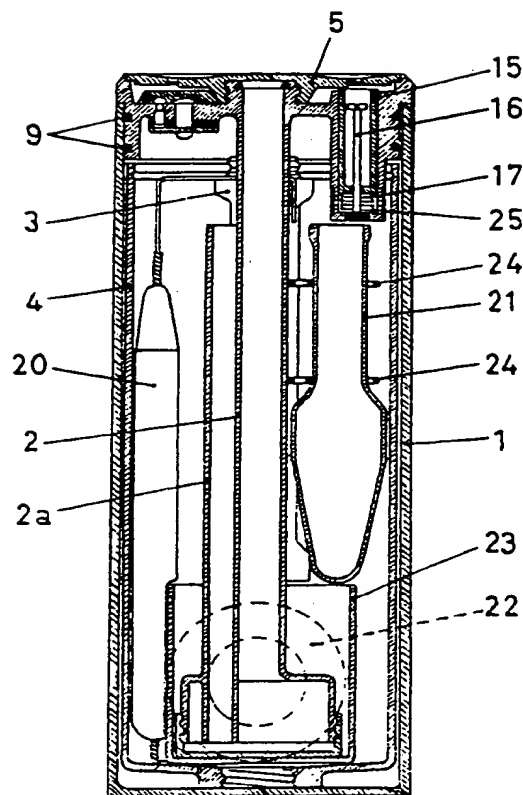


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)